

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-073528

(43)Date of publication of application : 17.03.1998

(51)Int.Cl.

G01N 15/14  
G01N 33/483

(21)Application number : 08-248875

(71)Applicant : TOA MEDICAL ELECTRONICS CO LTD

(22)Date of filing : 30.08.1996

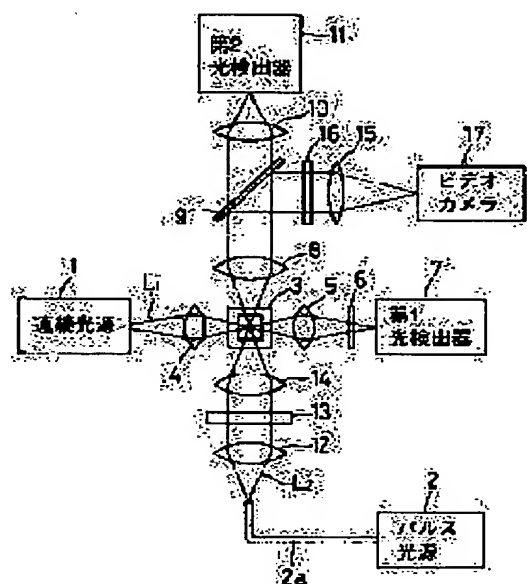
(72)Inventor : KUSUSAWA HIDEO  
KUBOTA FUMIO

## (54) FLOW CYTOMETER EQUIPPED WITH IMAGING FUNCTION

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a flow cytometer by which a cell in an intrinsically three-dimensional shape is analyzed with high accuracy by a method wherein a sample which contains particles is changed into a sample flow by using a sheath flow cell and the sample is irradiated with near-infrared rays so as to be imaged.

**SOLUTION:** A pulse light source 2 is a light source of a type which emits light only for an instant by a light-emitting trigger signal, and flowing particles can be imaged without any blur even when a sample flow is fast at a high speed by several m/sec. Pulsed light L2 is guided to a collimating lens 12 by a kaleidoscope 2a, and it is narrowed down to be fine by a condensing lens 14 via a cold mirror 13 so as to irradiate the sample flow in a sheath flow cell 3. The pulsed light which is transmitted through the sample flow is image-formed by a video camera 17 via a collimating lens 8, dichroic mirror 9, a condensing lens 15 and a band-pass filter 16, and the transmitted-light image of a cell is imaged. In addition, the pulsed light L2 is irradiated via an optical fiber 2a, its coherency is dropped, and the image of the nucleus part of the cell can be imaged with good contrast. An image signal from the video camera 17 is transferred to an image processing part so as to be analyzed and processed.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-73528

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月17日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 15/14			G 0 1 N 15/14	D
33/483			33/483	C

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平8-248875

(22) 出願日 平成8年(1996) 8月30日

(71) 出願人 390014960

東亜医用電子株式会社

兵庫県神戸市西区高塚台四丁目4番地の4

(72) 発明者 楠澤 英夫

神戸市中央区港島中町7丁目2番1号 東

亜医用電子株式会社内

(72) 発明者 久保田 文雄

神戸市中央区港島中町7丁目2番1号 東

亜医用電子株式会社内

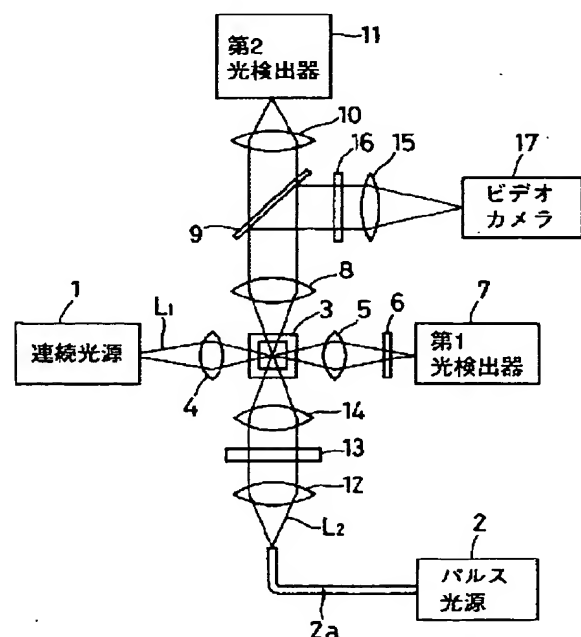
(74) 代理人 弁理士 野河 信太郎

(54) 【発明の名称】 撮像機能付きフローサイトメータ

(57) 【要約】

【課題】 細胞を変形させることなく、その核部分をコントラストよく撮像する。

【解決手段】 粒子含有試料を試料流に変換するシースフローセルと、近赤外光で前記試料流を照明する近赤外光源と、近赤外光で照明された試料流中の粒子を撮像する撮像器と、撮像された粒子像を画像処理する画像処理部を備える。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 粒子含有試料を試料流に変換するシースフローセルと、近赤外光で前記試料流を照明する近赤外光源と、近赤外光で照明された試料流中の粒子を撮像する撮像器と、撮像された粒子像を画像処理する画像処理部を備えた撮像機能付きフローサイトメータ。

【請求項2】 近赤外光源は、720～1500nmの波長の光を試料流に照明するものである請求項1記載のフローサイトメータ。

【請求項3】 試料流を照明する近赤外線は、コヒーレンス長が粒子径と同程度、又はそれ以下である請求項1記載のフローサイトメータ。

【請求項4】 近赤外光源が、パルスレーザーからなる請求項1記載のフローサイトメータ。

【請求項5】 試料流を可視光で照明する可視光源と、可視光で照明された試料流中の粒子からの光を検出する光検出素子と、試料流から光検出素子までの光路中に設けられ可視光を光検出素子に入射せしめて近赤外光を排除する第1光選択器と、試料流から撮像器までの光路中に設けられ近赤外光を撮像器に入射せしめ可視光を排除する第2光選択器と、光検出素子から得られた粒子信号に基づいて粒子を分析する粒子分析部とをさらに備えた請求項1記載のフローサイトメータ。

【請求項6】 可視光源は、400～700nmの波長の光を試料流に照明するものである請求項5記載のフローサイトメータ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 この発明は、撮像機能付きフローサイトメータに関し、特に細胞などの粒子撮像するための撮像系を備えるフローサイトメータに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、細胞の核部分を細胞質部分から弁別して分析する方法として次のような方法が知られている（例えば、特開平6-58926号公報参照）。つまり、細胞をスライド上に定着して洗浄した後、特別な染料で染色し、更に洗浄して余分な染料を除去し、これにカバーガラスをかけて細胞標本を作成し、そして、作成した標本に赤外線を照射して、細胞を撮像し、細胞像をデジタル化してコンピュータで分析を行うようにしている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、従来のこのような分析方法においては、細胞標本の作成に手間を要するばかりでなく、細胞がスライドとカバーガラスとに挟まれて偏平化し、立体的な形状を有する細胞本来の像を撮像することができないため、例えば、核部分の直径やプロフィールのような情報を正しく得ることができないという問題点がある。

【0004】 この発明は、このような事情を考慮してな

されたもので、粒子を含有する試料流に近赤外光を照射して撮像することにより、本来の立体的な形をした細胞の核部分をコントラストよく撮像することが可能で、またそれによって細胞の分析を高精度に行うことができる撮像機能付きフローサイトメータを提供するものである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 この発明は、粒子含有試料を試料流に変換するシースフローセルと、近赤外光で前記試料流を照明する近赤外光源と、近赤外光で照明された試料流中の粒子を撮像する撮像器と、撮像された粒子像を画像処理する画像処理部を備えた撮像機能付きフローサイトメータを提供するものである。

## 【0006】

【発明の実施の形態】 この発明のシースフローセルは、粒子（細胞）を含む試料をシース液で包んで流すことにより流体力学的効果によって細い試料液の流れを形成させることのできるフローセルであり、これには従来公知のものをを用いることができる。

【0007】 この発明の対象とする粒子は、血液や尿に含まれる血球や細胞を主としているが、特に限定されない。

【0008】 粒子を撮像するについて、粒子を照明する光の波長が短いと、光が粒子表面及び内部において散乱や吸収による減光が大きくなり、粒子内部を画像化することができない。

【0009】 逆に光の波長が長いと、①粒子による減光が少なくなる（粒子透過性が大きくなる）。②水の吸光度が増大する。③画像分解能が低下する。これらのことにより良好な画像が得られない。

【0010】 よって、粒子内部をコントラストよく撮像するために近赤外光源は、波長が720～1500nmの範囲にある近赤外光を試料流に照明するものであることが好ましい。具体的には、近赤外パルス半導体レーザー（720～980nm）、カラーセンターレーザー（600～900nm）、色素レーザー（600～1200nm）、YAGレーザー（1.064μm）、YLFレーザー（1.048μm）、又はTiサファイアレーザー（モードロックタイプでキャビティダンパー付）などにより構成される。

【0011】 粒子を撮像する撮像器には、一般的な2次元画像を撮像するビデオカメラを使用してもよいが、その場合には微弱な蛍光増を増幅するイメージインテンシファイアを備えたものをを用いることが好ましい。さらに、そのイメージインテンシファイアにはシャッター手段を備えてもよい。

【0012】 画像処理部は、CPU、ROMおよびRAMからなるマイクロコンピュータによって構成することができる。さらに、近赤外光源から試料流への光路中に設けられ試料流を照明する近赤外光のコヒーレンシー

(可干渉性)を低下させる光学素子をさらに備え、コヒーレンス長を粒子径と同程度又はそれ以下にすることが好ましい。

【0013】コヒーレンシーを低下させる光学素子としては、特開平7-134093号公報に記載されたものを使用することができる。

【0014】この発明は、試料流を可視光で照明する可視光源と、可視光で照明された試料流中の粒子からの光を検出する光検出素子と、試料流から光検出素子までの光路中に設けられ可視光を光検出素子に入射せしめ近赤外光を排除する第1光選択器と、試料流から撮像器までの光路中に設けられ近赤外光を撮像器に入射せしめ可視光を排除する第2光選択器と、光検出素子から得られた粒子信号に基づいて粒子を分析する粒子分析部をさらに備えてもよい。第1光選択器と第2光選択器は1つの光学素子で実現されていてもよく、別々の光学素子で実現されていてもよい。

【0015】可視光源は、試料流に照明する光が400～700nmの波長を有することが好ましい。

【0016】また、近赤外光の波長が720～1500nm、可視光の波長が400～700nmの場合には、第1光選択器として700nmより短い波長を光検出素子に入射せしめ、第2光選択器として700nmあるいは720nmよりも長い波長を撮像器に入射せしめる光学素子をそれぞれ使用すればよい。

【0017】

【実施例】この発明の実施例における光学系を図1に示す。この実施例では、散乱光や蛍光を検出するための連続発光光源1と、細胞像を撮像するためのパルス光源2との2つの光源を設けている。光源1は可視光源、光源2は近赤外光源である。

【0018】なお、光源1には、中心波長が488nmの可視光を発するArレーザーを使用し、光源2には、中心波長が780nmで、スペクトル幅が7nmの図3に示すスペクトル特性を備えた近赤外光を発するパルスレーザダイオードを使用している。

【0019】この2つの光源1、2からの連続可視光L1とパルス近赤外光L2は、角型のシースフローセル3(図1では紙面に垂直方向に試料流が流れる)に対して互いに直交するように照射している。

【0020】この照射領域に細胞が流れてくると、その細胞による前方散乱光が集光レンズ5によって集められ、バンドパスフィルター6を介してフォトダイオードからなる第1光検出器7で受光される(ビームストップは図示しない)。細胞の側方散乱光は、コリメートレンズ8、ダイクロイックミラー9およびコンデンサレンズ10を介して光電子増倍管からなる第2光検出器11で受光、増倍される。

【0021】なお、第1光検出器7は波長選択された複数の光をそれぞれ検出する複数の光検出素子を含んでも

よい。この場合、各光検出素子により、前方散乱光や前方蛍光などを検出することができる。

【0022】同様に、第2光検出器10は波長選択された複数の光をそれぞれ検出する複数の光検出素子を含んでもよい。この場合、各光検出素子により、側方散乱光や側方蛍光を検出することができる。

【0023】図2はこの実施形態の信号処理系の構成を示し、第1および第2光検出器7、11によってそれぞれ検出された粒子信号、即ち、前方散乱光強度信号S1および側方蛍光強度信号S2は、データ処理部100の粒子分析部100aに入力され、各検出信号パルスの高さ情報がA/D変換され、散乱光強度と蛍光強度の2つの特徴パラメータが生成される。

【0024】撮像制御部100cは信号S1、S2がデータ処理部100に入力されると同時又は所定時間後に細胞を撮像するための発光トリガ信号Tsをパルス光源2に対して供給する。

【0025】パルス光源2は、発光トリガ信号Tsによって一瞬だけ(25ナノ秒程度)発光するタイプの光源であり、試料流の流速が数m/秒と高速であっても、流れる粒子をブレ無く撮像することができる。

【0026】パルス光L2は図1に示すように、コヒーレンス低下手段の一例であるカライドスコープ(マルチモード光ファイバーでも可能である)2aによってコリメートレンズ12へ導かれ、コールドミラー13を通過してコンデンサレンズ14によって細く絞られて試料流に照射される。

【0027】光ファイバー2aを介して照射することにより、パルス光L2のコヒーレンシーが落ち、後述するように細胞の核部分の像をコントラスト良く撮像することができる。なお、光ファイバー2aには、コア径800μm、長さ2m(住友電工株式会社製MKH-800)のものをを用いている。

【0028】試料流を透過したパルス光は、コリメートレンズ8によって平行光に変換されダイクロイックミラー9に反射されて、コンデンサレンズ15とバンドパスフィルター16を介してビデオカメラ17の受光面に結像され、細胞の透過光像が撮像される。ビデオカメラ17からの画像信号Vsは図2に示す画像処理部100bに渡され、デジタル画像として記憶、保存される。

【0029】粒子分析部100aは、前方散乱光および側方蛍光強度の特徴パラメータに基づいてスキャッタグラム(2次元散布図)を生成し、その解析を行う。

【0030】なお、入力部200はキーボードやマウスからなり、データ処理部100に対して各種の指令や条件の設定などを行う。また、出力部300はCRTやプリンタからなり粒子分析部100aと画像分析部100bで得られたスキャッタグラム、粒子像および解析結果などを出力する。

【0031】ここで、波長488nmの光で励起され波

長500～700nmの光として発せられる蛍光を検出するために、500～700nmの波長の光を透過させ700nm以上の波長の光を反射するダイクロイックミラー9を使用している。そして、波長780nm以上の近赤外光画像を得るために、さらに、780nmの波長の光を透過させるバンドパスフィルター16を使用している。

【0032】従って、ビデオカメラ17には、可視光L1(488nm)によって細胞から生じた側方の光は入射しないので、ビデオカメラ17は光源1からの光の影響を受けない良好な細胞画像を得ることができる。

【0033】同様に、第2検出器11にはダイクロイックミラー9の作用により、可視光L1によって生じた側方の光のみが入射するので、第2検出器11は、光源2からの光の影響を受けない良好な粒子信号を得ることができる。

【0034】また、バンドパスフィルター6には、488nmの波長の光を透過させるものを使用しているので、第1光検出器7には、可視光L1によって生じた前方散乱光のみが入射し、近赤外光L2によって生じた側方の光は全く入射しないので、第1光検出器は光源2からの光の影響を受けない良好な粒子信号を得ることができる。

【0035】試料流に含まれる細胞は球形に近い形状を有するので、可視光を用いると、細胞表面及び細胞質部分において散乱・吸収による減光により細胞内部を鮮明に画像化することは難しい。しかし、近赤外領域の波長の光については、細胞表面及び細胞質部分での減光が小さいために内部を鮮明に画像化しやすい。

【0036】図4は、この実施例によって得られた細胞画像の7つの例を示し、図5はその比較例(撮像用のパルス光源2として波長が523nmの可視光源を使用したもの)として2つの細胞画像例を示している。

【0037】なお、この実施形態では、近赤外線を照射する光源として赤外光パルスレーザーのような単色性の高い光源を使用し、光学素子により、その光のコヒーレンシーを低下させている。そのことにより、核部分の細胞質部分に対する減光比を最適に調整し、それによって核部分が鮮明に写った画像を得るようにしている(この実施形態では、コヒーレンス長さを5～6μmに設定している)。

【0038】また、近赤外線光源を、波長帯域の広い赤外線ランプと、波長幅を制限する狭帯域フィルターとで代用することも可能である。

【0039】この実施形態では、図1に示すように、レンズ12とレンズ14との間の光のコリメート領域には、赤外光を透過し可視光を反射するコールドミラー13が設けられている。従って、可視光L1によって照射

された細胞から生じる側方散乱光や側方蛍光の内、レンズ14側に入射したものは、コールドミラー13で反射されて第2光検出器11へ導かれる。これによって、検出される光の強度が増大し、とくに第2光検出器11の収集効率が向上する。

【0040】なお、このようなコールドミラーをシースフローセル3とレンズ14の間に設置することも可能であるが、この場合には、コールドミラーを凹面ミラーとする必要がある上、その位置の設定が容易でない。

【0041】これに対して、この実施形態におけるコールドミラー13は光路コリメート領域に設けられているので、平面ミラーを用いることができると共に、その位置設定が容易である。

【0042】

【発明の効果】この発明によれば、細胞を変形させることなくその核部分をコントラストよく撮像することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の実施例の光学系を示す構成図である。

【図2】この発明の実施例の信号処理系を示す構成図である。

【図3】この発明の実施例の光源のスペクトル特性図である。

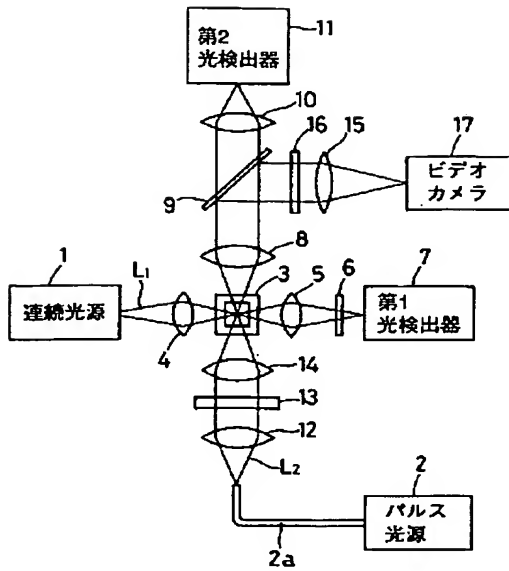
【図4】この発明の実施例によって得られた細胞画像例(顕微鏡写真)である。

【図5】図4の画像に対する比較例を示す画像例(顕微鏡写真)である。

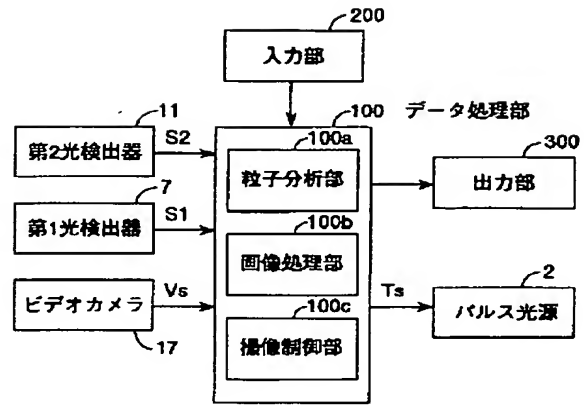
【符号の説明】

- |    |            |
|----|------------|
| 1  | 連続発光光源     |
| 2  | パルス光源      |
| 2a | 光ファイバー     |
| 3  | シースフローセル   |
| 4  | コンデンサレンズ   |
| 5  | 集光レンズ      |
| 6  | バンドパスフィルター |
| 7  | 第1光検出器     |
| 8  | コリメートレンズ   |
| 9  | ダイクロイックミラー |
| 10 | コンデンサレンズ10 |
| 11 | 第2光検出器     |
| 12 | コリメートレンズ   |
| 13 | コールドミラー    |
| 14 | コンデンサレンズ   |
| 15 | コンデンサレンズ   |
| 16 | バンドパスフィルター |
| 17 | ビデオカメラ     |

【図1】

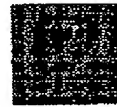
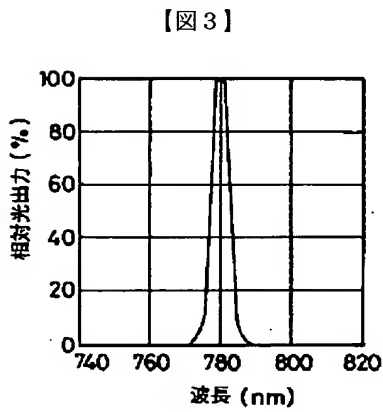


【図2】



【図4】

図面代用写真



(6)

特開平10-73528

【図5】

図面代用写真

